

MetaCell[®] IncreaSect 900

化学成分确定培养基

产品简介

MetaCell[®] IncreaSect 900是一款昆虫细胞无血清培养基，支持SF9昆虫细胞高密度悬浮培养，应用于昆虫杆状病毒表达平台。MetaCell[®] IncreaSect 900完全培养基包含3种组分，MetaCell[®] IncreaSect 900 和 CD Lipid Concentrate A、MetaCell[®] Glycerin，按照1:1:1000配比搭配使用。

MetaCell[®] IncreaSect 900已含有12mM谷氨酰胺。

产品名称	产品编码	包装规格	储存条件	有效期	推荐使用范围				
MetaCell [®] IncreaSect 900	P3200-X005	5L	2-8°C 密闭、避光	12个月 (暂定)	用于支持SF9细胞系的 生长和维持				
	P3200-X050	50L							
	P3200-X200	200L							
CD Lipid Concentrate A	RL5000A-0005	5mL			2-8°C 密闭、避光	12个月 (暂定)	配套脂质添加剂		
	RL5000A-0050	50mL							
	RL5000A-0200	200mL							
MetaCell [®] Glycerin	RM0166-0005	5mL					2-8°C 密闭、避光	12个月 (暂定)	配套添加剂
	RM0166-0050	50mL							
	RM0166-0200	200mL							

本产品适用于科研和基于细胞培养的大规模生物制品的生产，但不可直接用于人体或作为药物使用。

推荐培养条件

培养基: MetaCell[®] IncreaSect 900

细胞系: SF9

培养类型: 悬浮

培养参数设置:

摇瓶体积	125mL	250mL	500mL
培养体积 (mL)	25-35	60-70	120-140
摇床转速	120 ± 5 rpm (振幅 19mm) 110 ± 5 rpm (振幅 25mm) 95 ± 5 rpm (振幅 50mm)		
摇瓶类型	PETG 或者 PC 材质, 透气, 无挡板		
培养环境	27 ± 0.5 °C, 0% CO ₂ , 不需要额外增加湿度, 确保适当的气体交换并尽量避光培养		

MetaCell® IncreaSect 900 配液方法 (以1kg为例)

1. 在干净的容器中添加920g的超纯水或注射用水 (水温20-30℃)。
2. 称取 41.808-41.976g培养基干粉缓慢倒入培养基容器, 搅拌5分钟, 此时溶液处于浑浊状态。培养基每升标示量: 41.892g/L。
3. 添加5mol/L氢氧化钠溶液8mL, 搅拌溶解60分钟。
4. 添加碳酸氢钠0.349g-0.351g至培养基溶液中, 继续搅拌溶解20分钟, 此时溶液应基本澄清。碳酸氢钠每升标示量为: 0.350g/L。
5. 添加5mol/L氢氧化钠溶液或5mol/L盐酸溶液调节pH至所需范围内 (建议范围为: 6.20-6.30)。
6. 补加1mL脂质添加剂CD Lipid Concentrate A, 搅拌分散。
7. 补充添加MetaCell® Glycerin 1mL (1.25g), 搅拌溶解。
8. 补水定容至溶液净重为998-1002g, 搅拌5-10分钟。如pH出现明显变化, 继续用5mol/L氢氧化钠溶液或5mol/L盐酸溶液调节pH至6.20-6.30范围内。
9. 使用0.22μm除菌级滤膜除菌过滤至合适容器, 2-8℃避光保存。

细胞复苏

1. 干冰运输的细胞应立刻复苏或放置在液氮环境下3-7天后再进行细胞复苏。
2. 从液氮罐中取出一支冻存细胞, 置于37℃水浴锅中, 水浴1-2分钟, 注意观察冻存管里细胞冰块状态。
3. 以细胞原有特性决定复苏时是否需要离心:
 - (1) 如果细胞需要离心, 先预热29mL的MetaCell® IncreaSect 900培养基30分钟以上, 用以备用。取9mL已预热MetaCell® IncreaSect 900培养基至离心管中, 加入细胞液, 轻轻吹打混匀, 200×g离心5分钟, 弃上清, 使用已预热的MetaCell® IncreaSect 900培养基重悬细胞, 然后全部转移至125mL摇瓶中, 最终培养体积为20mL。混匀后取样测定细胞密度和活率, 细胞密度范围应在 $1.2-1.3 \times 10^6$ cells/mL。
 - (2) 如果细胞无需离心 (例如 ExpiSf9™ Cells), 轻轻吹打混匀冻存管内的细胞液, 全部转移至装有预热 MetaCell® IncreaSect 900 培养基的 125mL 摇瓶中, 最终培养体积为 20mL。
4. 建议的摇床培养参数为27℃, 0% CO₂, 95 ±5rpm (振幅50mm)。
5. 培养3-4天, 待细胞状态进入对数生长早期, 密度 $5.0-7.0 \times 10^6$ cells/mL, 活率≥90%时, 将SF9细胞以 $0.9-1.1 \times 10^6$ cells/mL 传代培养, 推荐至少连续传代三次后进行后续实验。

注: 若细胞复苏3代后, 细胞生长状态正常, 活率≥95%, 应尽快安排冻存。

细胞传代

1. 根据细胞计数结果, 将SF9细胞按照 $0.9-1.1 \times 10^6$ cells/mL接种, 培养3天传代, 细胞至少传代3次后再进行后续实验。
2. 细胞悬浮培养稳定后, 应尽快冻存。一般情况下SF9细胞按照 $0.9-1.1 \times 10^6$ cells/mL接种, D3活细胞密度可达到 $5.0-7.0 \times 10^6$ cells/mL, 活率≥95%。

细胞冻存

1. 准备好足量的处于对数生长早期且活率≥95%细胞作为冻存用细胞。
2. 最终的细胞冻存密度应控制在: $25-28 \times 10^6$ cells/mL。
3. 配制冻存液: 90%条件培养基+10% DMSO (亦可使用90% MetaCell® IncreaSect 900+10% DMSO), 2-8℃下预冷30分钟备用。

4. 取适量细胞悬液，200×g离心5分钟，弃上清，用冻存液重悬后，按照冻存规格，立即将细胞悬液分装至冻存管中（即在1.8mL冻存管中分装1mL）。
5. 按照标准程序（每分钟降低1°C），在自动或手动控制速率的冷冻设备中实现冷冻保存。
6. 将冷冻细胞转移至液氮（气相）（储存温度范围：-200°C至-125°C）中储存。

细胞驯化

大多数情况下，无血清培养的SF9细胞可以直接适应MetaCell[®] IncreaSect 900，如果有需要，亦可通过逐渐驯化使其适应于MetaCell[®] IncreaSect 900中生长。

注：用于驯化的SF9细胞需要处于对数生长期的早期，且活率≥90%。

● 直接驯化法

1. 对于可以直接驯化的细胞，当细胞活率≥90%且处于对数生长早期时，可尝试直接接种到MetaCell[®] IncreaSect 900中。
2. 最初培养阶段，SF9细胞按照初始密度 $1.0-1.1 \times 10^6$ cells/mL接种，培养3-4天后，细胞活率应≥90%，如果活率较低，则需要采用间接驯化法。
3. 连续传代3-5次，细胞状态及生长正常后，可以开始后续实验。

● 间接驯化法

1. 将原培养基和MetaCell[®] IncreaSect 900按75: 25比例混合，接种密度为 $1.0-1.1 \times 10^6$ cells/mL。
2. 培养3-4天后，细胞密度达到 $5.0-7.0 \times 10^6$ cells/mL传代，
 - (1) 如细胞生长状态良好，且活率≥90%，则传代时调整原培养基与MetaCell[®] IncreaSect 900的比例为50: 50。
 - (2) 如有细胞生长缓慢、细胞结团严重等不稳定状态，可对细胞进行离心换液，离心条件为200×g，离心5分钟。此时的混合培养基依旧为原培养基和MetaCell[®] IncreaSect 900以75: 25比例混合。
3. 重复步骤2并逐渐增加MetaCell[®] IncreaSect 900所占的比例（推荐比例 50: 50， 25: 75），直到使用100%的MetaCell[®] IncreaSect 900进行细胞培养。
4. 在100%的MetaCell[®] IncreaSect 900中继续培养2-3代，当细胞密度达到 $5.0-7.0 \times 10^6$ cells/mL，且细胞活率≥90%，方可认为驯化完成。连续稳定传代3代以上，方可进行后续实验。

-----最初修订日期：2024.05-----

-----最新修订日期：2024.09-----